



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES E DE β -
GLICOSIDASE DO FUNGO *ANNULOHYPHONYX STYGIUM* DR47 EM
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Rafaela Coimbra De Luca

Florianópolis

2017

RAFAELA COIMBRA DE LUCA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES E DE β -GLICOSIDASE DO
FUNGO *ANNULOHYPXYLON STYGIUM* DR47 EM RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação
em Engenharia de Alimentos, Departamento de
Engenharia Química e de Alimentos do Centro de
Tecnologia da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para a obtenção do Título
de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Robl

Florianópolis

2017

Este trabalho é dedicado à minha filha,
meu coração fora de mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Álvaro, Maria Olívia e José Carlos, por me guiarem sempre pelo caminho do bem, por todo amor e carinho dedicado à mim e à Isa e pelo esforço em fazer com que os percalços da vida sejam percebidos de uma maneira mais leve.

Aos meu “irmãos” Mirna, Thiago e Lucas, por nos apoiarmos e estarmos sempre juntos nas lágrimas e nos sorrisos.

À minha avó Leda, por ser a fortaleza que segura e protege cada um da família com toda a sua delicadeza.

À minha tia Sandra e seus filhos Rodrigo e Gabriel por todo carinho, conversas e conselhos.

Às crianças da família Isabella e Arthur por me provarem que a luta tem outra importância quando se tem por quem ganhar.

Ao meu orientador, professor e amigo Diogo Robl, por me receber com tanto carinho no laboratório e por toda a dedicação para que este trabalho tivesse sucesso.

À minha amiga de Iniciação Científica, Beatriz, por todas as conversas, risadas e momentos de descontração vividos no laboratório.

À Universidade Federal de Santa Catarina e aos professores do curso de graduação em Engenharia de Alimentos, por todo o conhecimento transmitido, fundamentais para a realização deste trabalho.

À todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Deus por orquestrar tudo que nos cerca com tanta sabedoria e amor.

Muito obrigada!

*“E o céu será tua casa, voará com tuas asas
Não se abalará por pouco, amaremos feito loucos
Será livre como nunca e sorrirá como sempre
Reinaremos por direito e que assim seja feito.”*

(Delacruz e Maria)

RESUMO

Enzimas vem sendo amplamente aplicadas industrialmente devido a sua capacidade de otimizar processos. Entretanto, como o custo deste biocatalisador influencia na viabilidade final do processo, uma alternativa para reduzir o custo de enzimas fúngicas é o uso de resíduos agroindustriais como substratos na sua produção. Uma aplicação em potencial para enzimas é na produção de biocombustível a partir do bagaço da cana-de-açúcar – material lignocelulósico composto basicamente por celulose, hemicelulose e lignina -, no entanto para que este material seja degradado em açúcares fermentescíveis é necessário o uso de coquetéis celulolíticos, um conjunto de enzimas capazes de catalisar tal hidrólise, β -glicosidase é uma enzima presente nestes coquetéis. Tendo isso em vista, este trabalho teve como objetivo otimizar a produção de pectinase e β -glicosidase, pelo fungo endofítico *Annulohypoxylon stygium* DR47, utilizando resíduos agroindústrias como substrato, em cultivo submerso. Inicialmente uma padronização do inóculo foi realizada. A melhor produção enzimática ocorreu com um pré-inóculo, incubado por 48h, contendo a biomassa micelial fragmentada em *blender* e cultivada em frutose (2 gL^{-1}), como fonte de carbono. Posteriormente ensaios contendo resíduos agroindustriais no meio de produção enzimática foram feitos para definir qual apresentava maior potencial para a produção conjunta das enzimas estudadas. O bagaço cítrico foi o material que se mostrou um bom substrato para a produção de ambas enzimas ($2.36\text{ U}_{\text{pectinase.mL}^{-1}}$; $1.82\text{ U}_{\beta\text{-Glicosidase.mL}^{-1}}$), já o bagaço de maçã ($2.92\text{ U}_{\text{pectinase.mL}^{-1}}$; $0.03\text{ U}_{\beta\text{-glicosidase.mL}^{-1}}$) e o farelo de soja ($0.65\text{ U}_{\text{pectinase.mL}^{-1}}$; $2.54\text{ U}_{\beta\text{-glicosidase.mL}^{-1}}$) foram bons substratos somente para pectinase ou para β -glicosidase. Com estes resultados, escolheu-se utilizar o bagaço cítrico para o planejamento experimental, no qual utilizou-se a metodologia de Plackett & Burman para seleção dos componentes do meio de cultura que afetam significativamente a secreção de pectinase e β -glicosidase pelo fungo, Para pectinase obteve-se diferença estatisticamente significativa na dosagem feita em 144h, que revelou um efeito negativo na adição de ZnSO_4 ao meio e positivo para os componentes: Ureia, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e MnSO_4 . Diferenças significativas na secreção de β -Glicosidase foram observadas nas dosagens feitas em 72 e 144h, mostrando um efeito positivo na adição de Ureia e peptona no meio de cultivo. Contudo, para otimização da produção, mais experimentos utilizando delineamentos compostos centrais devem ser realizados para avaliar o comportamento da Ureia, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e MnSO_4 na produção das enzimas estudadas.

Palavras-chave: Celulases; glicohidrolases; enzimas.

ABSTRACT

Enzymes have been widely applied industrially because of their ability to optimize processes. However, the cost of enzymatic hydrolysis influences the final process viability; an alternative to reduce the cost of fungal enzymes is the use of agro-industrial residues as substrates in their production. A potential application for enzymes is in the production of biofuel from sugarcane bagasse - a lignocellulosic material composed basically of cellulose, hemicellulose and lignin - for this material to be degraded in fermentable sugars, it is necessary to use cellulolytic cocktails, an enzymatic mixture capable of catalyzing this hydrolysis. β -glucosidase is an enzyme present in these cocktails. This study aimed to optimize the production of pectinase and β -glucosidase by the endophytic fungus *Annulohyphomyces stygium* DR47 using agro-industrial residues as substrate in submerged culture. Initially was performed the inoculum standardization. The best enzymatic production was verified with a pre-inoculum, incubated for 48h, containing a blender fragmented mycelium cultivated in fructose (2 gL^{-1}), as a carbon source. Subsequently, tests containing agro-industrial residues in the enzymatic production medium were done to determine which residue possess high production of both enzymes. The citrus bagasse was the best substrate for the production of both enzymes ($2.36 \text{ U}_{\text{pectinase}} \cdot \text{mL}^{-1}$; $1.82 \text{ U}_{\beta\text{-glucosidase}} \cdot \text{mL}^{-1}$). Apple bagasse ($2.92 \text{ U}_{\text{pectinase}} \cdot \text{mL}^{-1}$; $0.03 \text{ U}_{\beta\text{-glucosidase}} \cdot \text{mL}^{-1}$) and soybean bran ($0.65 \text{ U}_{\text{pectinase}} \cdot \text{mL}^{-1}$; $2.54 \text{ U}_{\beta\text{-glucosidase}} \cdot \text{mL}^{-1}$) were good substrates only for pectinase or β -glucosidase. In this way, it was chosen citrus bagasse for experimental design using Plackett & Burman methodology to select culture media components that significantly affect the secretion of pectinase and β -glucosidase. Enzymatic activities were measured at 48, 72 and 144 h. For pectinase, a statistically significant difference was observed only at 144h and showed a negative effect of ZnSO_4 and positive for urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and MnSO_4 . Significant differences in β -glucosidase production were observed at 72 and 144 h, and showed a positive effect of urea and peptone. However, for optimization of production, further experiments using central composite design should be performed to evaluate the behavior of urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and MnSO_4 in the production of the enzymes studied.

Keywords: Cellulases; glycohydrolases; enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação da estrutura de materiais lignocelulósicos, com seus três principais componentes: Celulose, Hemicelulose e Lignina.....	18
Figura 2- Representação esquemática da molécula de celobiose sendo hidrolisada, obtendo como produto duas moléculas de glicose.....	19
Figura 3- Representação do sinergismo entre as celulasas, presentes no complexo celulolítico, para a degradação da estrutura da celulose.....	21
Figura 4- <i>Annulohypoxylon stygium</i> , incubado por 7 dias em meio BDA.....	22
Figura 5- Fluxograma do processo realizado no teste com diferentes fontes de carbono no meio de produção enzimático.....	24
Figura 6- Fluxograma dos processos realizados nos testes para padronização do inóculo: (A) obtenção da biomassa micelial e (B) fonte de carbono.....	25
Figura 7- Fluxograma dos processos realizados nos testes de inibição com licor.....	25
Figura 8- Comparação entre teor de (a) proteínas totais, atividades enzimáticas de (b) β -glicosidase e de (c) pectinase, obtidos nas fermentações contendo a biomassa raspada e fragmentado em <i>blender</i>	29
Figura 9- Fotografia dos frascos contendo (a) biomassa raspada e (b) fragmentada em <i>blender</i>	30
Figura 10- Influência das diferentes fontes de carbono do meio de pré-cultura no teor de (a) proteínas e na produção das enzimas (b) β -glicosidase e (c) Pectinase.....	31
Figura 11- Microscopia realizada com aumento de 10x, após 48h de incubação, das fermentações contendo diferentes concentrações de licor como fonte de carbono: (a) 10%, (b) 20%, (c) 30%, (d) 40%, (e) 50% e (f) 80%.....	33
Figura 12- Atividades enzimáticas medidas ao longo das fermentações com diferentes fontes de carbono. Em (a) atividade enzimática de β -glicosidase e em (b) pectinase.....	34
Figura 13- Diagramas de Pareto dos experimentos referentes ao planejamento experimental em 144h de fermentação, em: (a) Pectinase e (b) β -glicosidase.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Variáveis avaliadas no planejamento experimental e os níveis adotados.....	26
Tabela 2- Composição do Licor do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana concentrado.....	33
Tabela 3- Dosagens enzimáticas dos ensaios do planejamento experimental em 144h de fermentação.....	36
Tabela 4- Análise estatística do planejamento Plackett & Burman aplicando as dosagens enzimáticas de pectinase (144h).....	38
Tabela 5- Análise estatística do planejamento Plackett & Burman aplicando as dosagens enzimáticas de β -glicosidase (144h).....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.2 OBJETIVO	13
1.2.1 Objetivo geral.....	13
1.2.2 Objetivos específicos.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 ENZIMAS.....	14
2.2 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS ENZIMAS	14
2.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS	16
2.3.1 Processos fermentativos	16
2.3.2 Materiais lignocelulósicos como fonte de carbono	17
2.4 GLICOHIDROLASES	18
2.4.1 β -glicosidase.....	18
2.4.2 Pectinase.....	19
2.4.3 Enzimas de coquetéis celulolíticos.....	20
2.5 <i>ANNULOHYPOXYLON STYGIUM</i>	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 MATÉRIAS PRIMAS	23
3.2 LINHAGEM	23
3.3 MEIOS DE CULTIVO	23
3.4 EXPERIMENTOS EM FRASCOS AGITADOS	24
3.4.1 Teste de inóculo para a pré-cultura	24
3.4.2 Teste de fontes de carbono do meio de pré-cultura.....	24
3.4.3 Testes de inibição com licor.....	25
3.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	25
3.6 AMOSTRAGEM	26
3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	26
3.8 PROTEÍNA TOTAL.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	28
4.1.1 Biomassa micelial	28
4.1.2 Fonte de carbono	30
4.2 SELEÇÃO DA FONTE DE CARBONO PARA O MEIO DE PRODUÇÃO	32

4.2.1 Inibição por licor do tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar	32
4.2.2 Ensaios com diferentes fontes de carbono	33
5 CONCLUSÃO	40
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO A – Composição dos meios ensaiados no planejamento experimental.	46
ANEXO B – Dosagens enzimáticas dos ensaios do planejamento experimental.	47

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas e desenvolvimentos envolvendo enzimas e suas aplicações estão cada vez mais frequentes, isso se deve à reconhecida capacidade catalítica que estas possuem em diversas reações, possibilitando a melhoria de processos produtivos mantendo a qualidade dos produtos. Deste modo, este biocatalisador movimenta anualmente bilhões de dólares e são aplicados industrialmente nos mais diversos setores desde alimentício, têxtil, papel e celulose, áreas médicas, até tratamento de efluentes.

Uma classe de enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas é conhecida como glicohidrolases, sendo as β -glicosidases e pectinases biocatalisadores pertencentes a esta classe. As β -glicosidases (E.C. 3.2.1.21) são catalisadoras da clivagem de ligações β -glicosídicas em glicosídeos de baixa massa molecular e suas aplicações industriais são variadas, podendo atuar em processos como: liberação de aromas em sucos e vinhos; liberação de compostos antioxidantes a partir de resíduos vegetais; e principalmente na composição de coquetéis celulolíticos para a desconstrução de resíduos agroindustriais. Já as pectinases são um grupo de enzimas capazes de clivar as moléculas de pectina por hidrólise ou por trans-eliminação e sua importância no mercado de enzimas é tal que chegam a representar cerca de 20% das enzimas comercializadas mundialmente (KUMAR *et al.*, 2014), isso por ser um biocatalisador amplamente aplicados em indústrias, principalmente para a produção de bebidas.

A obtenção de enzimas podem se dar através da extração de tecidos vegetais e animais ou, ainda, produzidas por micro-organismos. Embora as duas primeiras formas de obtenção sejam bastante difundidas e estudadas, o fato de enzimas produzidas por micro-organismos não depender de fatores sazonais, apresentar elevada produção e menores custo de produção (devido a possibilidade de aproveitamento de resíduos agroindustriais como substrato) faz com que as enzimas de origem microbiana venham ganhando espaço em pesquisas e em novos processos produtivos. A produção de enzimas possui custo bastante elevado, tornando fundamental que esta seja feita através de micro-organismos selecionados e cultivados em substratos que, potencializando a produção das enzimas de interesse, possibilitem uma redução no valor de produção destes biocatalizadores.

Um micro-organismo pouco estudado e com potencial para produção de glicohidrolases é o *Annulohypoxylon stygium*, um fungo filamentoso endofítico. Uma otimização do cultivo

deste fungo voltada para a produção de β -glucosidase e pectinase, além de mais pesquisas sobre a hidrólise de materiais lignocelulósicos por estas enzimas, podem auxiliar na formulação de um coquetel enzimático efetivo na degradação de biomassa vegetal além de reduzir os custos destas enzimas.

Estes coquetéis celulolíticos, ou enzimáticos, são constituídos por um conjunto de enzimas conhecidas como celulasas que aplicadas à materiais lignocelulósicos - resíduos agroindustriais - são capazes de promover a hidrólise deste material. A classificação das celulasas presentes nos coquetéis é feita de acordo com o seu local de atuação no substrato celulolíticos, podendo ser: endoglucanases, exoglucanases ou β -glucosidases. Existem ainda pesquisas científicas mostrando que estes complexos são beneficiados quando suplementados com outras enzimas, como por exemplo hemicelulasas e pectinases.

1.2 OBJETIVO

1.2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo otimizar a produção de extratos enzimáticos ricos em β -glicosidase e pectinase, pelo fungo *A. stygium* DR47, em resíduos agroindustriais.

1.2.2 Objetivos específicos

Para que o objetivo geral fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- padronizar a produção do inóculo fúngico quanto à obtenção da biomassa micelial e quanto à fonte de carbono utilizada;
- testar diferentes fontes de resíduos agroindustriais frente a produção de β -glicosidase e pectinase;
- otimizar o cultivo de *A. stygium* para a produção das enzimas β -glicosidase e pectinase, em resíduos agroindustriais através de planejamento experimental.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENZIMAS

Todas as enzimas, exceto um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam atividade catalítica, são proteínas que catalisam uma reação química específica. Assim, são catalisadores biológicos responsáveis por milhares de reações bioquímicas em sistemas vivos (MONTEIRO; SILVA, 2009). Sua eficiência catalítica é, em geral, muito maior que a dos catalisadores sintéticos ou inorgânicos, isso porque possuem características particulares como a especificidade pelo substrato e a capacidade de realizar apenas uma reação bioquímica com o mesmo. Essas características garantem elevadas taxas de conversão à um determinado produto, sem que haja formação de subprodutos (NELSON; COX, 2014).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) estabeleceu, em 1964, um sistema para nomear e classificar as enzimas. Em geral as enzimas catalisam a transferência de elétrons, átomos ou grupos funcionais, deste modo, o sistema estabelecido para classificação e nomenclatura divide as enzimas em seis diferentes classes, separadas de acordo com: o tipo da reação de transferência, o grupo doador e o grupo aceptor que catalisam. São elas: oxirredutases; transferases; hidrolases; liases; isomerases; e, por fim, ligases (Berg et al., 2014). Para cada classe existe um código numérico correspondente, o mesmo acontece para a subclasses. Desta maneira, é possível atribuir um número classificatório de quatro dígitos e um nome sistemático que identifica cada enzima (NELSON; COX, 2014).

Quando comparadas aos catalisadores químicos, as enzimas possuem vantagens que justificam a sua ampla e crescente utilização, como o fato de serem produtos naturais, biológicos e biodegradáveis. Outras vantagens são o fato de não serem consumidas durante o processo, além da possibilidade de atuarem em pH neutro e temperaturas brandas (MONTEIRO; SILVA, 2009).

2.2 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS ENZIMAS

Atualmente as enzimas são amplamente utilizadas na área médica, agrícola, em pesquisas científicas e em indústrias (MONTEIRO; SILVA, 2009; NETO, 2001). Para que uma enzima seja comercialmente interessante para indústrias, ela deve proporcionar produtos com

qualidade maior que o original, melhorar o processo produtivo e possibilitar uma redução de custos de produção e maquinário envolvidos (CHEETHAM, 1985).

Na América Latina, o Brasil responde por 60% do consumo de enzimas desta região. Contudo, em termos mundiais, o Brasil representa apenas 3,7% do mercado internacional e permanece em posição de atraso tecnológico e estratégico em produção de biocatalisadores. Isso porque é um país que importa uma quantidade expressiva de enzimas, 86%, enquanto exporta apenas 14% (MONTEIRO; SILVA, 2009).

As principais indústrias consumidoras de enzimas são as de detergentes, processamento de amido, laticínios, cervejarias, suco de frutas e vinho, panificação, couro, têxtil e de papel (NETO, 2001). De acordo com uma pesquisa realizada em 2017, pela BCC Research, o mercado global de enzimas industriais atingiu aproximadamente US\$ 4,6 bilhões no ano 2014 e aumentou para US\$ 4,9 bilhões em 2015. Esta pesquisa ainda mostra que a estimativa para 2021 é que este mercado aumente para US\$ 6,3 bilhões e que neste ano o maior mercado consumidor de enzimas seja o de alimentos (DEWAN, 2017). O que pode ser justificado pela crescente procura, entre os consumidores, por alimentos com maiores qualidades sensoriais e nutricionais gerando uma força motriz para fomentar a pesquisa e desenvolvimento de produtos utilizando enzimas como aditivos alimentares ou a aplicação delas para o melhoramento de processos produtivos (KUMAR *et al.*, 2014).

Existem vários exemplos de aplicações de enzimas em alimentos com a finalidade de melhorar o produto final ou o processo de produção. Na indústria de panificação elas são utilizadas para diversas finalidades como aumentar a maciez e a textura da massa e do miolo, melhorar a estabilidade da massa, alterar a elasticidade e a textura do glúten e melhorar a cor e o sabor do produto final. Na indústria de laticínios são aplicadas na coagulação do leite para a produção de queijos e também utilizadas para impedir a adsorção de odores pela lactose. Já na indústria de sucos de frutas as enzimas possuem um papel importante na otimização de operações de extração, clarificação e filtração do suco (CHEETHAM, 1985; MONTEIRO; SILVA, 2009).

Outra aplicação para enzimas atualmente, é como coadjuvante na produção de etanol de segunda geração. O etanol de primeira geração, produto de destaque no mercado nacional, gera como resíduo a parte fibrosa da cana-de-açúcar constituída por polímeros como celulose e hemicelulose. Este resíduo pode ser utilizado na produção do etanol de segunda geração (MARTÍN *et al.*, 2006). Entretanto, um dos fatores fundamentais para que esta produção seja comercialmente possível é a redução do custo de produção (DIAS *et al.*, 2011). Os coquetéis

enzimáticos utilizados na despolimerização desta biomassa vegetal são considerados como um dos fatores econômicos mais impactantes, seguido pelo seu processo de pré-tratamento (MACRELLI; MOGENSEN; ZACCHI, 2012).

2.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS

A fermentação é um dos métodos mais antigos para a produção de enzimas, nele os micro-organismos (geralmente bactérias e fungos) retiram do meio em que estão inseridos os compostos necessários para a sua subsistência. Em alguns casos, estes compostos não estão disponíveis no meio reacional na forma em que o micro-organismo consegue consumir sendo necessário que este produza enzimas a fim de catalisar reações que possuam tais compostos como produtos (FEITOSA, 2009).

Para que um micro-organismo possa ser utilizado na produção de enzimas ele deve ser, preferencialmente, seguro do ponto de vista biológico. Além disso, outras características são fundamentais, como possuir alta capacidade de síntese e excreção da enzima, tolerar possíveis substâncias tóxicas geradas no processo de tratamento da matéria-prima ou pelo seu próprio metabolismo celular, requerer um espaço menor para o cultivo e suportar condições adversas do meio - como pressão, temperatura e pH (BASTOS, A., 2015).

O custo da produção de enzimas microbianas é fortemente influenciado pela produtividade do organismo empregado, isso mostra que a seleção do micro-organismo ideal para a produção da enzima de interesse é importante (KUMAR *et al.*, 2014), após a seleção o micro-organismo é cultivado em fermentadores para a produção do biocatalisador. Sempre que possível fatores como meio de cultivo, pH, temperatura, aeração e agitação devem ser otimizados possibilitando, assim, uma produção máxima da enzima em questão (MONTEIRO; SILVA, 2009).

2.3.1 Processos fermentativos

Podem ser utilizados dois tipos de cultivo na produção de enzimas: o cultivo submersa ou o cultivo em estado sólido. A principal diferença entre estes é a quantidade de água disponível no meio reacional. Enquanto a fermentação em estado sólido ocorre em ausência, ou quase ausência de água livre, na fermentação submersa o conteúdo de água é superior a 95% (MONTEIRO; SILVA, 2009).

O cultivo submerso é considerado como uma reação de mistura perfeita, contendo, em todas as partes do reator e ao mesmo tempo, a mesma quantidade de micro-organismos, nutrientes e metabólitos (ZÚÑIGA, 2010). Mesmo com desvantagens econômicas, principalmente pela maior demanda energética exigida durante o processo (CASTRO; JUNIOR, 2010), esta é a técnica mais utilizada nos países ocidentais. Isso se deve ao fato desta possuir condições facilitadas para o crescimento dos micro-organismos, fácil ajuste de condições ideais como pH, temperatura, aeração, recuperação facilitada das enzimas produzidas, e aumento de escala (FEITOSA, 2009; FERNANDES, 2007).

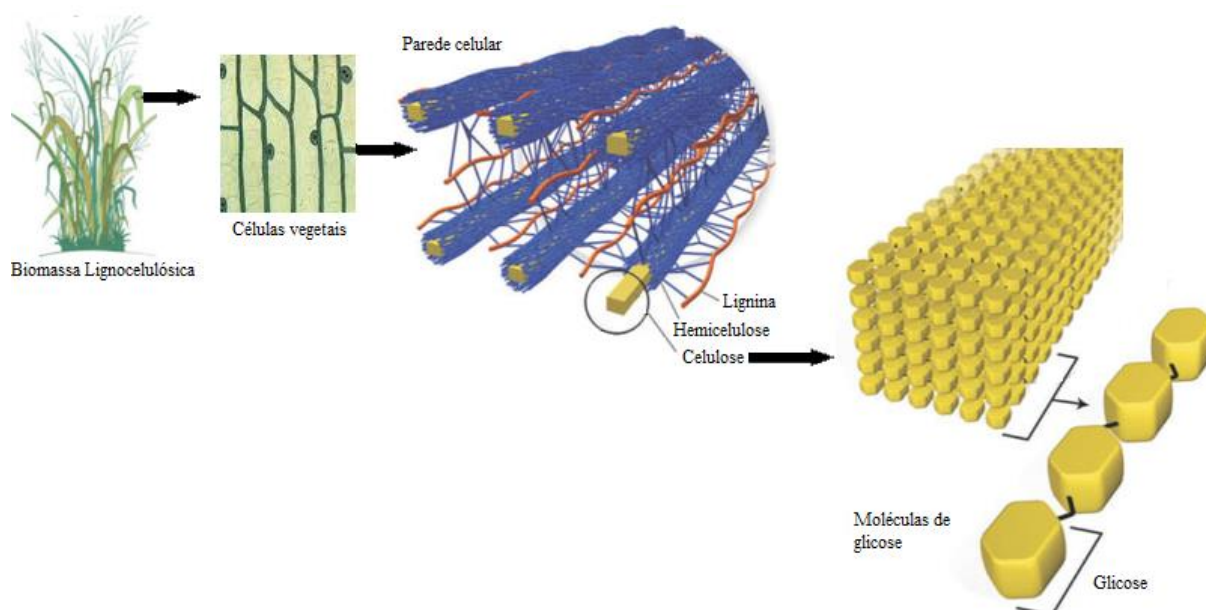
Já os sistemas de cultivo em meio sólido são heterogêneos em termos de micro-organismos e concentração de substrato (ZÚÑIGA, 2010). Este sistema, apesar de gerar volumes menores de resíduos; extratos consideravelmente menos diluído do que o obtido pelo cultivo submerso; e possuir menor possibilidade de contaminação, apresenta desvantagens como a quantidade limitada de micro-organismos capazes de crescer nestas condições e a dificuldade no controle do processo (CASTRO; JUNIOR, 2010).

2.3.2 Materiais lignocelulósicos como fonte de carbono

Os materiais lignocelulósicos representam cerca de 60% da biomassa vegetal da biosfera e podem ser divididos em: resíduos de colheitas (bagaço de cana, palha de milho, etc.), madeira de lei, madeira de conífera, resíduos celulósicos, biomassas herbáceas e resíduos sólidos municipais (RODRIGUES, 2014).

São materiais que possuem uma estrutura complexa, como pode ser observado na Figura 1, composta por celulose (30% a 50%), hemicelulose (15% a 35%), lignina (10% a 30%), materiais solúveis em água (como compostos inorgânicos e pectinas) e materiais solúveis em solventes orgânicos (como terpenos, graxas, ceras e fenóis) (RODRIGUES, 2014). A celulose é um polímero linear de glicose de alta massa molecular, podendo ter de 15 a 15.000 unidades de glicose, unidas entre si por ligações β -1,4-glicosídicas. A hemicelulose atua como elo entre a celulose e a lignina e é um grupo de polissacarídeos heterogêneo constituídos por unidades de açúcares como pentoses, hexoses, ácidos urônicos e radicais acetila. Já a lignina, um dos materiais mais resistentes da natureza, é um polifenol constituído por unidades de fenilpropanos (BRODEUR *et al.*, 2011).

Figura 1- Representação da estrutura de materiais lignocelulósicos, com seus três principais componentes: Celulose, Hemicelulose e Lignina.



Fonte: SANTOS, F. A. et al. (2012).

Combustíveis líquidos renováveis, como o bioetanol, podem ter seu custo de produção significativamente reduzido pelo uso destes resíduos como fontes de carbono na fermentação (DODD; CANN, 2009). Para que estes materiais sejam utilizados em processos de produção de etanol é necessário a desconstrução da sua estrutura recalcitrante, possibilitando a glicohidrólise da celulose e hemicelulose, o que é dificultada pela presença da lignina. Na natureza, este material é degradado por um conjunto de micro-organismos que sintetizam várias enzimas hidrolíticas capazes de degradá-los totalmente (ROBL *et al.*, 2013).

2.4 GLICOHIDROLASES

A variedade de ligações glicosídicas que ocorrem naturalmente é enorme, portanto, a diversidade de enzimas com função de clivar estas ligações é, também, bastante ampla. Tais enzimas são denominadas glicohidrolases, e é nesta classe que encontramos a β -glicosidase e a pectinase (WITHERS, 2001). No reino Fungi, várias espécies são potenciais produtores de β -glucosidases e/ou de pectinases, como por exemplo espécies do gênero *Trichoderma* (DELABONA *et al.*, 2013), *Penicillium* (DILLON *et al.*, 2006) e *Aspergillus* (de VRIES e colab., 1999).

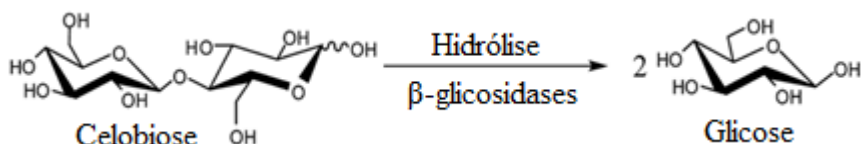
2.4.1 β -glicosidase

As β -glicosidases formam uma classe de enzimas que catalisam, principalmente, a hidrólise de ligações β -glicosídicas em glicosídeos de baixa massa molecular como dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos conjugados (WITHERS, 2001).

As funções destas enzimas na natureza são diversas, temos por exemplo a hidrólise de precursores de hormônios em plantas, a degradação da parede celular em processos de amadurecimento de frutos, a germinação de sementes e desenvolvimento de embriões, e a emissão de aromas em flores (DAROIT, 2007).

Embora muito se tenha estudado sobre as β -glicosidases produzidas por micro-organismos, o maior foco tem sido dado a sua aplicação e não a sua função endógena (VILELA, 2013). O interesse científico por estas enzimas surgiu na década de 1950 e se deu pelo potencial de aplicação na conversão biológica da celulose (ZANOELO *et al.*, 2004). As β -glicosidases são componentes de coquetéis enzimáticos utilizados na degradação de material lignocelulósico, onde são responsáveis por catalisar a hidrólise da celobiose produzindo glicose, como mostrado na Figura 2. Esta catálise é de extrema importância já que a celobiose causa um efeito inibitório na produção e ação das demais enzimas que compõem complexos celulolíticos (HARDIMAN *et al.*, 2010).

Figura 2- Representação esquemática da molécula de celobiose sendo hidrolisada, obtendo como produto duas moléculas de glicose.



Fonte: PENG *et al.* (2015).

Outras aplicações industriais destas enzimas podem ser encontradas no processamento de sucos e vinhos, auxiliando na liberação de compostos ricos em aromas; de compostos fenólicos com atividade antioxidante a partir de resíduos vegetais; e na síntese de oligossacarídeos e glicoconjugados (DAROIT, 2007).

2.4.2 Pectinase

Na natureza são encontradas diferentes pectinases com diversas formas de ação, são elas: poligalacturonase (PG), pectina esterase (PE), pectinaliase (PL) e pectatoliase (PAL). Elas são consideradas enzimas despolimerizantes, por clivarem a molécula de pectina, entre os

monômeros de ácido galacturônico, por hidrólise ou por trans-eliminação (BERGER, 2014; CARVALHO, 2016). As enzimas pectinolíticas podem ser produzidas por uma grande variedade de micro-organismos. Entretanto, em escala industrial os fungos filamentosos são os mais empregados, tendo este cenário praticamente dominado pelos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (SANTOS, S. F. M, 2007).

O uso de pectinases vem aumentando consideravelmente na última década, especialmente na indústria de processamento de frutas e vegetais, alimentos, têxtil e de papel e celulose. Atualmente estas enzimas representam cerca de 25% do mercado mundial de enzimas (UENOJO; PASTORE, 2007).

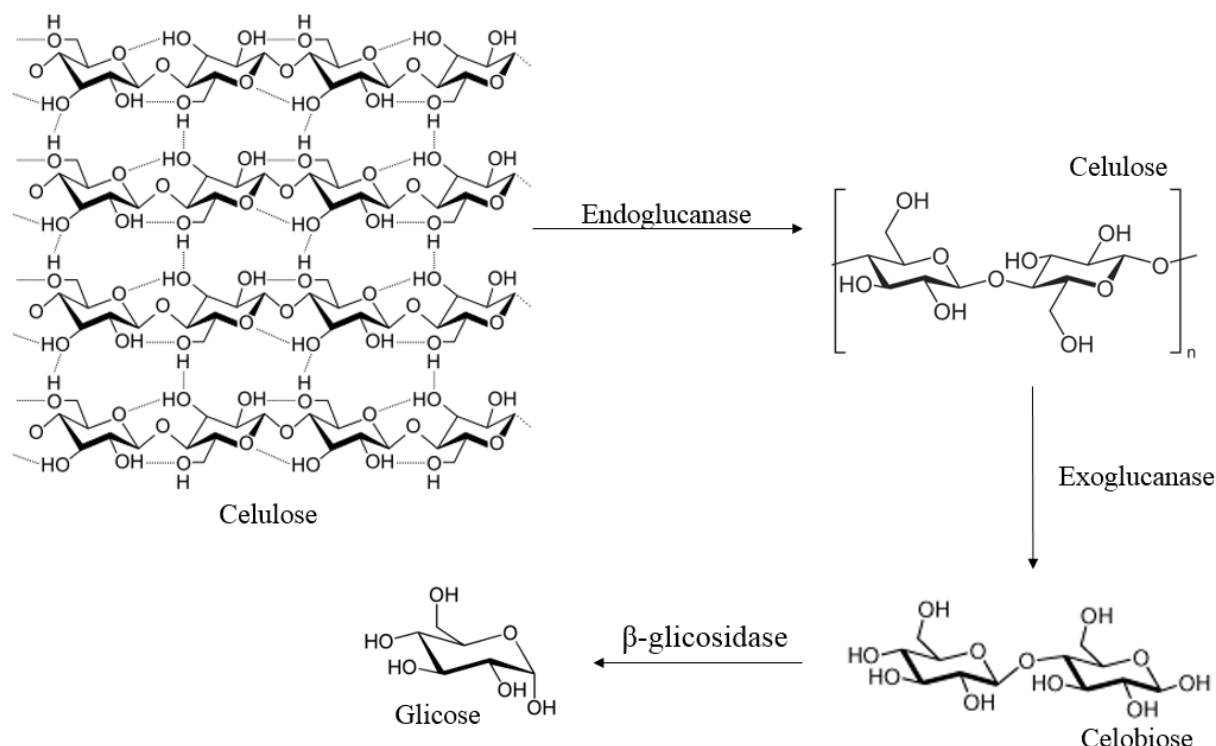
As aplicações industriais das enzimas pectinolíticas são diversas, sendo a principal delas na produção de sucos, vinhos e purês. Isso porque tais enzimas são capazes de diminuir a viscosidade e a turbidez do produto da prensagem de frutas. Auxiliam na clarificação de sucos, podendo reduzir em até 50% o tempo de filtração do produto final (BERGER, 2014). São também aplicadas para melhorar a extração de óleos vegetais; e na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais (UENOJO; PASTORE, 2007).

Para reduzir os custos desta enzima é necessário a busca contínua por micro-organismos capazes de produzir altos títulos enzimáticos com alta eficiência catalítica. Além da viabilização do uso de substratos alternativos, como resíduos agroindustriais (CARVALHO, 2016).

2.4.3 Enzimas de coquetéis celulolíticos

Para a degradação de materiais complexos é necessário que diferentes grupos de enzimas sejam usadas ao mesmo tempo. É o caso dos materiais lignocelulósicos, onde três ou mais grupos diferentes de enzimas são necessários para a sua degradação, os principais são: celulases, hemicelulases e ligninases. As celulases e hemicelulases são os constituintes principais destes complexos celulolíticos, já que degradam os principais componentes da parede celular capazes de serem convertidos à açúcares fermentescíveis (RODRIGUES, 2014). A classificação das celulases, como mostrado na Figura 3, é feita de acordo com seu local de atuação no substrato celulolítico, podendo ser: endoglucanases (EC 3.2.1.3), que clivam de forma randômica ligações glicosídicas internas da fibra celulósica gerando oligossacarídeos; exoglucanases (EC 3.2.1.91), que atuam na região externa dos oligossacarídeos produzidos pela endoglucanases, formando celobiose; e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam a celobiose produzindo glicose (FARINAS, 2011)

Figura 3- Representação do sinergismo entre as celulasas, presentes no complexo celulolítico, para a degradação da estrutura da celulose.



Fonte: FARINAS, (2011).

Complexos celulolíticos são beneficiados, em termos de rendimento e velocidade de conversão, quando suplementados com enzimas acessórias, como hemicelulasas e pectinasas (BERLIN *et al.*, 2006; GUSAKOV *et al.*, 2007). Por exemplo, a adição de uma pectinase comercial nos extratos de enzimas celulolíticas aumentou o rendimento da hidrólise de palha de milho (BERLIN *et al.*, 2006) e da deslignificação/explosão do bagaço de cana-de-açúcar (DELABONA *et al.*, 2013).

2.5 ANNULOHYPOXYLON STYGIUM

A busca por novas linhagens, oriundas de ambientes não usuais, capazes de produzir enzimas com maior estabilidade, maior produtividade e tolerantes a inibição por glicose, se fazer necessária para melhoria dos processos enzimáticos (ROBL *et al.*, 2015). Desta forma, encontramos o micro-organismo *Annulohypoxylon stygium*, figura 4, uma espécie encontrada geralmente na forma endofítica e que teve sua produção de glicohidrolases pouco explorada. Fungos endofíticos são micro-organismos que colonizam os tecidos, saudáveis, internos das plantas (seus hospedeiros) de uma maneira simbiótica, enquanto o micro-organismo se beneficia com nutrientes e proteção contra o ambiente e outros micro-organismos, fornece ao

hospedeiro resistência ambiental através dos metabólitos secundários produzidos pelo endofítico (NISA *et al.*, 2015; SULTAN *et al.*, 2014).

O gênero *Annulohypoxylon*, pertencente à família *Xylariaceae* (*Ascomycota*), foi considerado por algum tempo como uma parte do gênero *Hypoxylon*. Entretanto, devido a diferenças nas características morfológicas, taxonômicas e quimiotaxonômicas, percebeu-se que se tratava de um novo gênero (FOURNIER *et al.*, 2010; MACIEL, 2016). A capacidade de *A. stygium* de produzir glicohidrolases foi primeiramente relatada por (WEI *et al.*, 1992) e posteriormente confirmada por Robl *et al.* (2015). Estes autores também demonstraram a produção de enzimas pectinolíticas, e como extratos contendo estas atividades enzimáticas foram capazes de aumentar significativamente a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quando suplementados em coquetéis celulolíticos comerciais.

Figura 4- *Annulohypoxylon stygium*, incubado por 7 dias em meio BDA.



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIAS PRIMAS

Para a realização dos experimentos foi utilizado o bagaço de cana-de-açúcar “*In natura*” (sem pré-tratamento). A partir do bagaço de cana-de-açúcar “*In natura*”, foi realizado, em colaboração com o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), um pré-tratamento hidrotérmico (10% de bagaço, 190°C, 10 minutos, 1 hora de rampa de aquecimento, reator Parr modelo 4554 de 7,5L; EUA) conforme descrito por Robl *et al.* (2013). A composição das polpas foi realizada, ainda com o auxílio do CTBE, utilizando hidrólise ácida e HPLC de acordo com Sluiter *et al.* (2006). O farelo de soja foi obtido junto a Agrícola São Carlense (Biguaçu, SC Brasil), sendo caracterizados de acordo com Rodriguez-Zuniga *et al.* (2011). O bagaço cítrico, resíduo sólido obtido diretamente como fração sólida de extratora do processamento da fruta e foi fornecido pela Hildebrand (São Carlos - SP, Brasil).

3.2 LINHAGEM

A linhagem *A. stygium* DR47, um fungo endofítico de *Eucalyptus benthamii*, foi obtida a partir da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (LabMicro/UFPR). A linhagem é capaz de produzir altos títulos de β -glucosidase e pectinase (ROBL, 2015) e permaneceu armazenada em tubos com glicerol 20% a -80°C.

3.3 MEIOS DE CULTIVO

Para os cultivos em frascos agitados foi utilizado um meio base adaptado de Mandels and Reese (1960): 1 mL Tween 80; 0,3 gL⁻¹ ureia; 2,0 gL⁻¹ KH₂PO₄; 1,4 gL⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,4 gL⁻¹ CaCl₂.2H₂O; 0,3 gL⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1,0 gL⁻¹ proteose peptona; 5,0 mgL⁻¹ FeSO₄.7H₂O; 1,6 mgL⁻¹ MnSO₄.4H₂O; 1,4 mgL⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 2,0 mgL⁻¹ CoCl₂.6H₂O; 20gL⁻¹ de fonte de carbono. O pH foi ajustado para 5,0. O meio foi esterilizado a 121 °C por 20 min em autoclave. O meio de produção teve a mesma composição que o da pré-cultura, exceto pelas fontes de carbono. Nos experimentos, como é possível observar na figura 5, foram testadas as seguintes

fontes de carbono: farelo de soja, bagaço de cana pré-tratado hidrotêrmicamente, licor do pré-tratamento hidrotêrmico do bagaço de cana, bagaço de maçã e bagaço cítrico.

Figura 5- Fluxograma do processo realizado no teste com diferentes fontes de carbono no meio de produção enzimático.



3.4 EXPERIMENTOS EM FRASCOS AGITADOS

3.4.1 Teste de inóculo para a pré-cultura

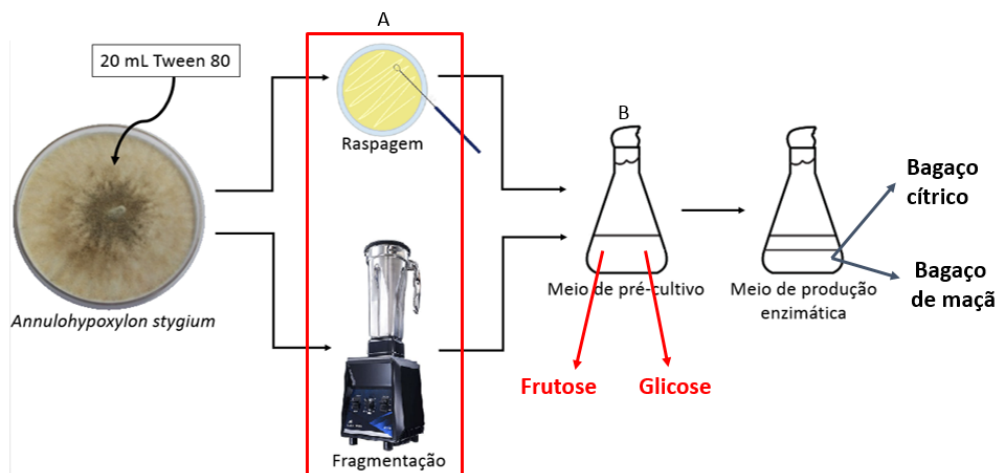
Foram testadas duas maneiras distintas de inóculos, ambas vinham da adição de 20 mL de *Tween 80* estéril (0.01% v/v) à uma cultura do fungo, previamente crescido em Agar Dextrose Batata (BDA) (7 dias à 28 °C). Na primeira forma de inóculo obteve-se a massa micelial através da raspagem da placa com o auxílio de uma pipeta estéril. Na segunda opção, ela foi obtida pela fragmentação de todo o micélio presente na placa através do uso de um *blender*, sendo testadas a fragmentação por 40s ininterruptos, figura 6. Um volume de 10 mL destas biomassas foram transferidas à meios de pré-cultura contendo glicose como fonte de carbono e incubadas por 48h a 28°C e 200 rpm. Após este período, 10 mL do meio de pré-cultura foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL do meio de produção e incubado a 28°C e 200 rpm por 144h. Alíquotas da pré-cultura foram analisadas em microscópio óptico para visualizar a formação das hifas.

3.4.2 Teste de fontes de carbono do meio de pré-cultura

Avaliou-se, no meio de pré-cultura, a influência de duas diferentes fontes de carbono na produção final de enzimas: glicose e frutose. Como é possível observar na figura 6, os inóculos foram obtidos da adição de 20 mL de *Tween 80* estéril (0,01% v/v) à colônia de micro-organismos (7 dias à 28°C), raspadas e posteriormente trituradas em *blender* estéril por 40s ininterruptos. Um volume de 10 mL desta biomassa foi adicionada a dois frascos contendo os meios de pré-cultura, o primeiro contendo 2 g/L de glicose ou frutose como fonte de carbono.

Um volume de 10 mL dos meios de pré-cultura foram transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 90 mL do meio de produção e incubados em agitador, a 28°C e 200 rpm, por 144h.

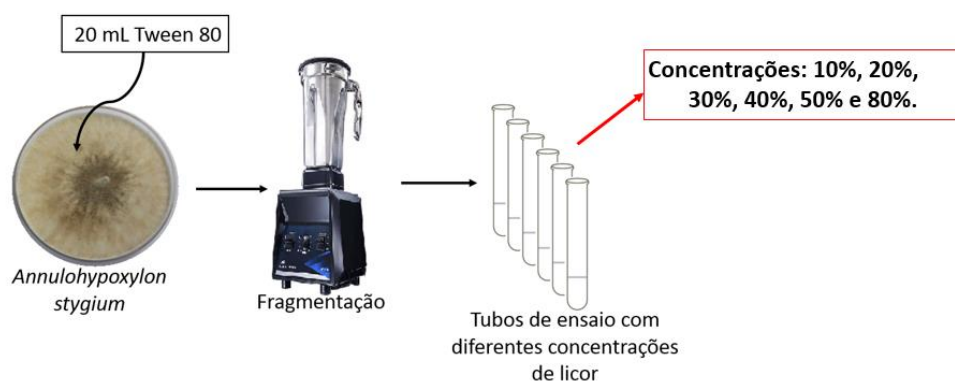
Figura 6- Fluxograma dos processos realizados nos testes para padronização do inóculo: (A) obtenção da biomassa micelial e (B) fonte de carbono.



3.4.3 Testes de inibição com licor

Um volume de 0.5 mL do homogeneizado de biomassa fúngica oriundo do *blender* (40s ininterruptos), foi inoculado em tubos de ensaio com 4,5 mL de meio de produção contendo licor do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana a 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% e 80% (v/v), figura 7. Em seguida foram incubados, em agitador, a 28°C e 200 rpm por 144h. Aliquotas foram analisadas em microscópio óptico para visualizar a formação das hifas.

Figura 7- Fluxograma dos processos realizados nos testes de inibição com licor



3.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para selecionar quais variáveis dos meios que influenciam na produção de β -glucosidase e pectinase, foi realizado planejamento experimental utilizando a metodologia de Plackett & Burman. Nele foram realizados 16 ensaios e três pontos centrais. Os parâmetros avaliados

foram os componentes do meio de produção de enzima principalmente os da solução de sais, mantendo o bagaço cítrico como fonte de carbono. Na tabela 1 é possível observar as variáveis do planejamento e os níveis adotados. A análise dos dados foi realizado no programa Protimiza Experimental Design.

Tabela 6- Variáveis avaliadas no planejamento experimental e os níveis adotados.

Variáveis	-1	1	Unidade
Ureia	0	0,6	gL ⁻¹
Peptona	0	2,0	gL ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	2,8	gL ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0	4,0	gL ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0	0,8	gL ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0	0,6	gL ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	0	100,0	mgL ⁻¹
MnSO ₄ .4H ₂ O	0	3,2	mgL ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0	2,8	mgL ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0	4,0	mgL ⁻¹
Tween 80	0	2,0	mlL ⁻¹

3.6 AMOSTRAGEM

Amostras foram retiradas periodicamente durante os cultivos, centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 10°C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) e os sobrenadantes dosados para as atividades enzimáticas respectivas, proteínas totais e medidas de pH.

3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A quantificação das atividades enzimáticas, expressas em unidades internacionais (IU), foi realizada utilizando diferentes substratos. A atividade enzimática de pectina cítrica (Sigma Aldrich), ensaiada a 0,5% (p/v) em reação de 10 minutos à 37 °C, foi determinada a partir da quantidade de açúcar redutor liberado a partir dos diferentes substratos polissacarídicos, utilizando o método DNS (MILLER, 1959) com glicose como padrão. As atividades de β -glucosidase foram medidas a partir dos resíduos p-nitrofenol- β -glicosídeo (Sigma-Aldrich, EUA). As reações foram conduzidas utilizando 20 μ L do sobrenadante diluído e 80 μ L do respectivo pNP (0,5 mM diluído em 50 mM de tampão). As reações foram incubadas por 10 minutos a 50°C e finalizadas pela adição de 100 μ L de Na₂CO₃ (1M). A absorbância foi

determinada a 400nm para β -glicosidase e 540nm para pectinase em multileitora de placas Spectramax Paradigm. Para todas as dosagens utilizou-se tampão citrato de sódio pH 5,0 (50 mM de tampão) nos sobrenadantes do fungo.

3.8 PROTEÍNA TOTAL

A concentração de proteínas totais foi determinada empregando o método recomendado para o reagente preparado da Bio-Rad (Protein Assay Reagent Concentrate) para placas de 96 poços, que é baseado no método de Bradford (1976), mas emprega o reagente concentrado. A leitura da cor formada após a reação é realizada em leitora de placas no comprimento de onda 595 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

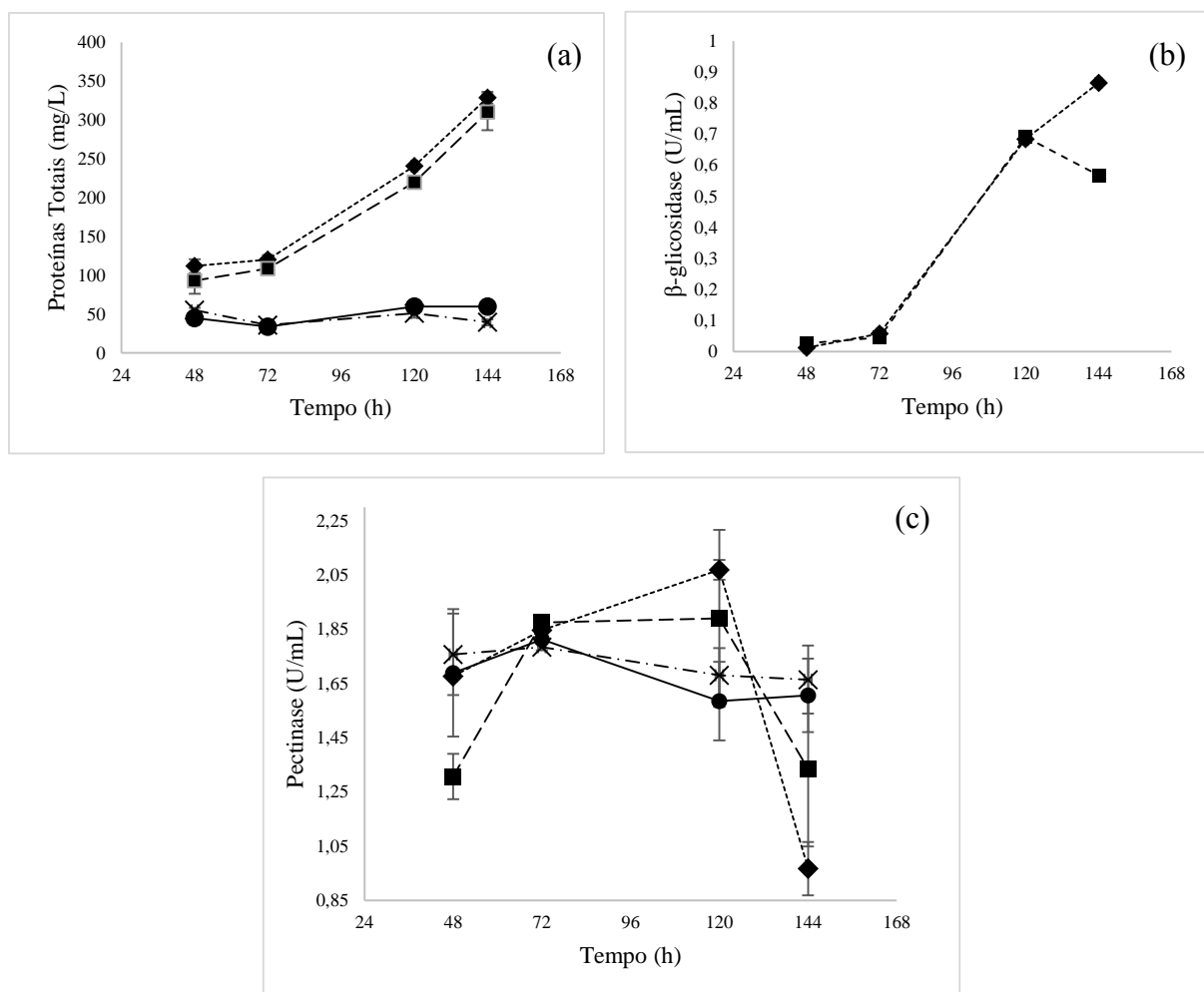
Os primeiros experimentos realizados foram com o objetivo de padronizar um inóculo que fosse mais adequado ao objetivo de otimização da produção de pectinase e β -glicosidase pelo micro-organismo *A. stygium* em cultivo submerso. Deste modo, testamos duas formas de obtenção da massa micelial, raspando a placa e fragmentando-a em *blender*. Já que segundo pesquisas a fragmentação do micélio tem como consequência a formação de uma meio de produção mais homogêneo, com menor número de *pellets* e maior número de hifas apicais, região do micro-organismo onde ocorre a secreção de enzimas (LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006). Ainda visando esta padronização do inóculo, testamos duas fontes de carbono no meio de pré-inóculo: glicose e frutose, ambas presentes na concentração 2 gL⁻¹.

4.1.1 Biomassa micelial

Após a dosagem das atividades enzimáticas verificou-se que independente da forma de obtenção da biomassa as produções enzimáticas se mantiveram próximas (Figura 8). Para pectinase, a diferença média entre os valores obtidos ao longo do cultivo com o inóculo raspado e com o inóculo fragmentado no ensaio com bagaço cítrico foi 0,16 UmL⁻¹; já no que utilizava bagaço de maçã foi 0,045 UmL⁻¹. Para β -glicosidase, na fermentação utilizando Bagaço Cítrico esta diferença média foi 0,041UmL⁻¹, no ensaio com bagaço de maçã não houve a produção desta enzima (dados não mostrados).

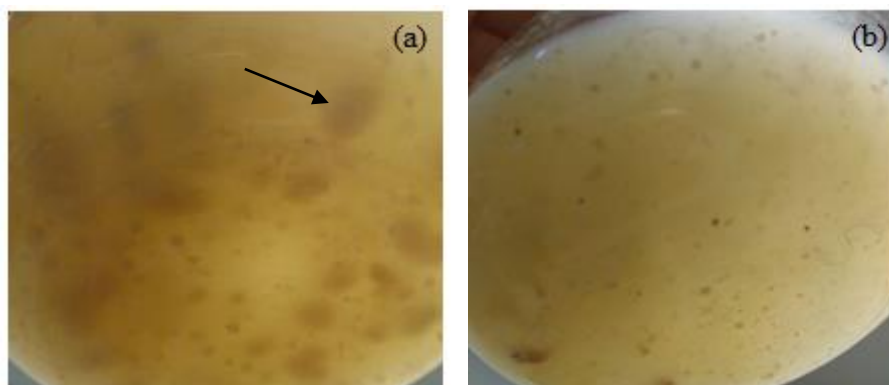
Estes resultados corroboram com o que foi observado por Loguercio-Leite *et al* (2006), revelando que mesmo o fungo necessitando se recuperar dos danos causados pelo ação do *blender* à sua estrutura, a produção enzimática final foi pouco alterada assim como a quantidade de proteínas totais.

Figura 8- Comparação entre teor de (a) proteínas totais, atividades enzimáticas de (b) β -glicosidase e de (c) pectinase, obtidos nas fermentações contendo a biomassa raspada e fragmentado em *blender*. (♦) Bagaço cítrico e biomassa raspada, (■) Bagaço cítrico e biomassa fragmentada, (●) Bagaço de maçã e biomassa raspada, (x) Bagaço de maçã e biomassa fragmentada em *blender* (-b).



Uma análise visual dos frascos contendo os pré-inóculos (48 horas de incubação), percebe-se aquele contendo a biomassa raspada apresenta *pellets*, tornando-o bastante heterogêneo quando comparado àquele que recebeu a biomassa fragmentada, Figura 9. Considerando um futuro cultivo em biorreator esta característica foi determinante para a escolha da fragmentação da biomassa micelial em *blender* como a melhor opção para ser utilizada na continuidade do trabalho, uma vez que interferências negativas causadas pelos crescimentos do fungos em sensores, chicanas e agitadores são minimizados.

Figura 9- Fotografia dos frascos contendo (a) biomassa raspada e (b) fragmentada em *blender*. A flecha indica a formação de *pellets*.



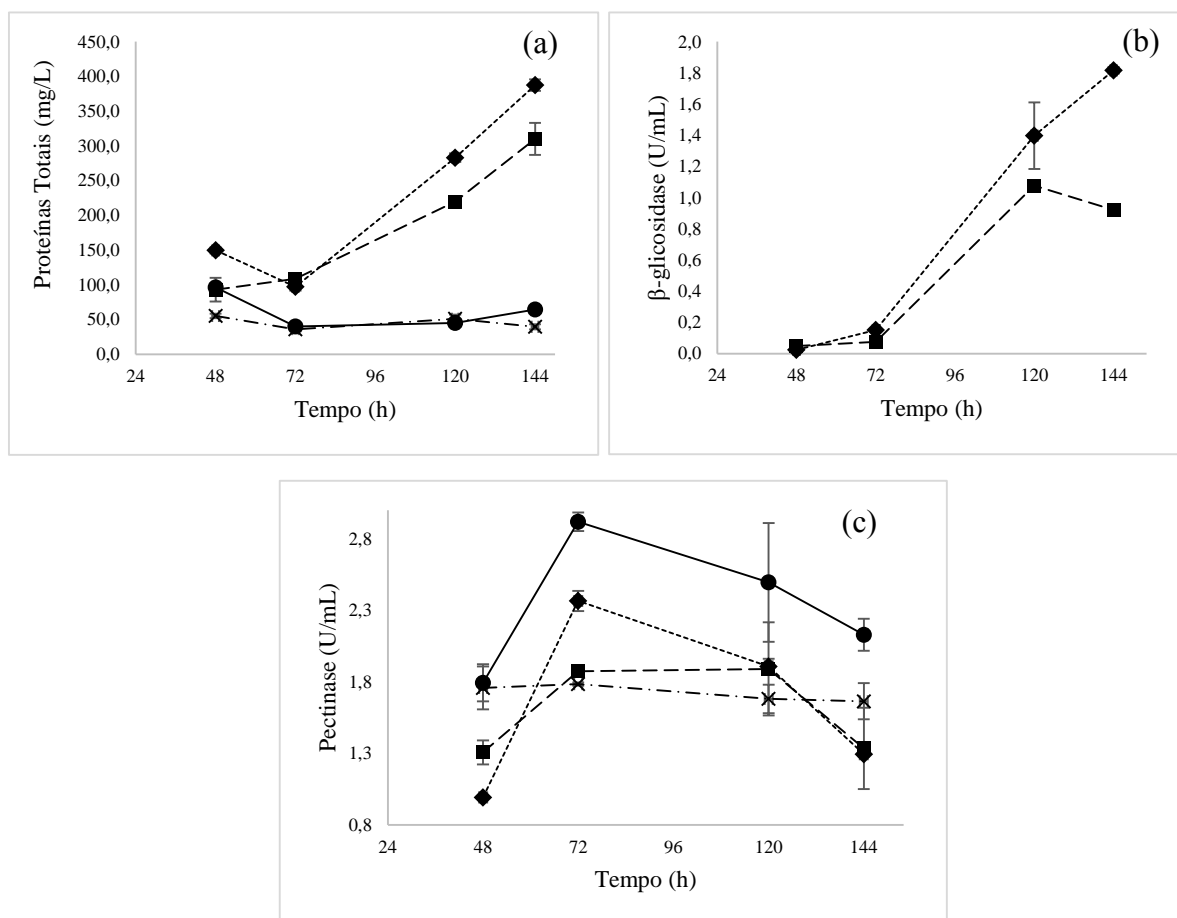
4.1.2 Fonte de carbono

Tendo definido a forma de obtenção da biomassa micelial como sendo a fragmentada em *blender*, passamos ao teste seguinte para padronização do inóculo testando a resposta do micro-organismo na produção enzimática quanto a fonte de carbono utilizada no meio de crescimento do fungo. Para isso, foram ensaiados meios de pré-cultura que diferiam entre si apenas na fonte de carbono, glicose ou frutose (2gL^{-1}). Nos meios de produção enzimática foram utilizados bagaço cítrico e bagaço de maçã como fonte de carbono.

Os resultado obtidos neste teste estão mostrados nos gráficos da Figura 10. Neles verifica-se uma diferença nas atividades enzimáticas quando utilizamos glicose ou frutose como fonte de carbono, sendo os resultados obtidos com frutose superiores àqueles obtidos com glicose. Nos ensaios contendo bagaço cítrico no meio de produção enzimática, obtivemos, com inóculo cultivado com frutose: atividade de pectinase igual a $2,4\text{ UmL}^{-1}$, em 72h de fermentação; e atividade de β -glicosidase igual a $1,8\text{ UmL}^{-1}$, em 144h de fermentação. No mesmo meio de produção enzimática, com glicose na pré-cultura, obtivemos: atividade de pectinase igual a $1,9\text{ UmL}^{-1}$ no pico de produção, 72h de fermentação; e atividade de β -glicosidase igual a $0,9\text{ UmL}^{-1}$ no pico de produção, em 144h de fermentação.

Para os inóculos com bagaço de maçã no meio de produção enzimática, não houve produção de β -glicosidase tanto nos ensaiados com frutose quanto nos ensaiados com glicose (dados não mostrados). Entretanto, pôde-se notar diferença na produção de pectinase nestes ensaios, obtendo no contendo frutose $2,9\text{ UmL}^{-1}$, e naquele com glicose $1,8\text{ UmL}^{-1}$, ambos medidos no pico de produção desta enzima que acontece em 72h de fermentação.

Figura 10- Influência das diferentes fontes de carbono do meio de pré-cultura no teor de (a) proteínas e na produção das enzimas (b) β -glicosidase e (c) Pectinase. (♦) Bagaço cítrico e frutose, (■) Bagaço cítrico e glicose, (●) Bagaço de maçã e frutose, (x) Bagaço de maçã e glicose.



A produção de enzimas hidrolíticas extracelulares demanda alto custo energético ao micro-organismo e a regulação dos genes que codificam estes biocatalizadores acontece de tal forma que a sua síntese ocorra apenas em condições onde o fungo realmente necessita utilizar um polímero como fonte de carbono, evitando a produção desnecessária de enzimas extracelulares (BROWN *et al.*, 2013; DUTRA, 2013). Dentro do filo Ascomycota este fenômeno é conhecido como repressão catabólica de carbono (CCR) e sua regulação ocorre de maneira semelhante em várias espécies por um regulador transcricional. Em *Aspergillus niger* e *Aspergillus nidulans* o CCR é mediado pela proteína CreA (DRYSDALE; KOLZE; KELLY, 1993; P. DE VRIES; VISSER; DE GRAAFF, 1999), em *Trichoderma reesei* por Cre1 (NAKARI-SETÄLÄ *et al.*, 2009), em *Acremonium cellulolyticus* por CreA (FUJII; INOUE; ISHIKAWA, 2013). Essas proteínas atuam inibindo a expressão dos genes de glicohidrolases principalmente na presença de baixas concentrações de glicose, 0,5 – 1g/L (RUIJTER; VISSER, 1997). Devido a isto se testou a capacidade de melhoria do processo utilizando a frutose como fonte de carbono para a produção do inóculo. Segundo Rujitler e Visser (1997) a

frutose é considerada um repressor intermediário, ou seja, a repressão é induzida somente em altas concentrações desse açúcar. Isto corrobora com os dados encontrados neste experimento (Figura 10), no qual os meios de produção inoculados com biomassa crescida em frutose produziram mais atividade de pectinase e β -glicosidase do que quando crescido em glicose.

4.2 SELEÇÃO DA FONTE DE CARBONO PARA O MEIO DE PRODUÇÃO

Inicialmente realizou-se um teste para avaliar o crescimento e secreção enzimática pelo *A. stygium* quando cultivado em Licor do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana, em seguida passou-se aos experimentos com diferentes fontes de carbono.

4.2.1 Inibição por licor do tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar

No processo para a desconstrução do bagaço de cana-de-açúcar em açúcares fermentescíveis uma etapa de pré-tratamento anterior à hidrólise enzimática se faz necessária, isso porque devido à natureza recalcitrante desta biomassa a hidrólise dos polissacarídeos se torna muito lenta e sem grandes rendimentos (SANTOS, F. A. *et al.*, 2014). Um método físico-químico, o pré-tratamento hidrotérmico, vem sendo muito utilizado e chama atenção por não utilizar reagentes químicos. Ele consiste em cozinhar a biomassa em água quente - 180 a 220°C - pressurizada, após este pré-tratamento são formadas duas frações: uma sólida, bagaço tratado hidrotérmicamente, rica em celulose; e uma líquida, chamada Licor, rica em hemicelulose e lignina (SILVA, 2009).

Uma análise de composição deste licor foi realizada, em parceria com o CTBE, e nela podemos perceber que apesar de ser um resíduo rico em xilose, ele apresenta altas concentrações de componentes inibitórios ao crescimento microbiano como hidrometil furfural, ácido fórmico, ácido acético e lignina (Tabela 2). Desta forma, para avaliar o comportamento da linhagem *A. stygium* DR47 para produção de pectinases e β -glicosidase neste resíduo foram feitos ensaios com diferentes concentrações deste licor como fonte de carbono, sendo as concentrações utilizadas: 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 80%. O crescimento do microorganismo foi observado através de microscopia após 48h de incubação e foram feitas dosagens enzimáticas ao longo da fermentação somente para os frascos que indicaram crescimento.

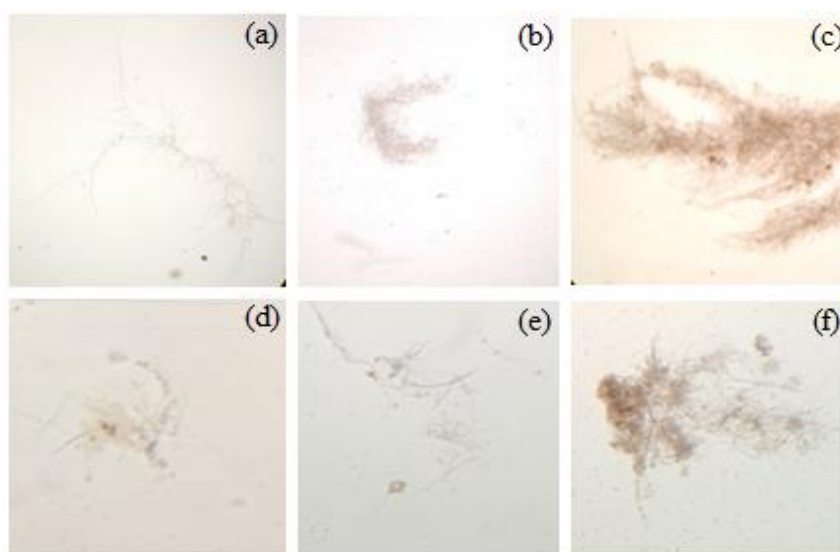
Tabela 7- Composição do Licor do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana concentrado, realizado em parceria com o CTBE.

Componente	gL ⁻¹
Xilose	25.40
Lignina solúvel	9.04
Ácido acético	2.20
Arabinose	2.08
Glicose	1.89
Ácido fórmico	0.11
HMF	0.10
Ácido Levulínico	0.00
Furfural	0.00

Como pode-se observar na Figura 11, houve crescimento fúngico em todas as concentrações de licor, o que revela uma boa resistência deste fungo aos componentes tóxicos da lignina. Entretanto, apenas no meio contendo 10% de licor detectou-se atividade enzimática: pectinase, com pico em 72h de fermentação, apresentou produção de 0,85 UmL⁻¹; enquanto a β -glicosidase, com pico em 144h, teve produção de 0,32 UmL⁻¹.

A lignina é um polímero de fenilpropano e possui capacidade de inibir e muitas vezes inativar a atividade enzimática de diversas glicohidrolases, seja por processos de desnaturação ou por ligação irreversível aos sítios catalíticos (OGEDA; PETRI, 2010).

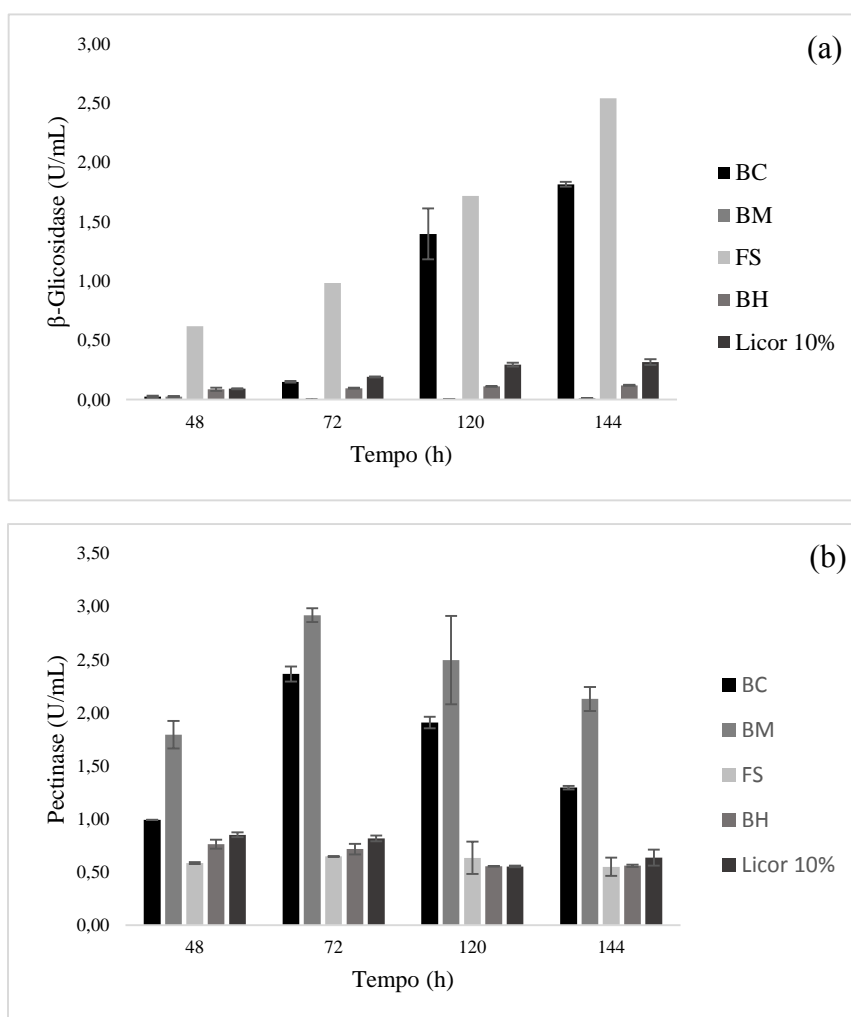
Figura 11- Microscopia realizada com aumento de 10x, após 48h de incubação, das fermentações contendo diferentes concentrações de licor como fonte de carbono: (a) 10%, (b) 20%, (c) 30%, (d) 40%, (e) 50% e (f) 80%.



4.2.2 Ensaios com diferentes fontes de carbono

Diferentes fontes de carbono foram testadas no meio de produção enzimático com o objetivo de identificar aquela que induz o *A. stygium* à maiores produções enzimáticas de pectinase e β -glicosidase. Os resíduos agroindustriais utilizados, foram: farelo de soja (FS), bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente (BH), bagaço cítrico (BC), bagaço de maçã (BM) e licor do pré-tratamento hidrotérmico. Os quatro primeiros foram testados em concentrações de 2gL^{-1} enquanto o licor foi testado na concentração de 10% (v/v). O sobrenadantes destas culturas foram retirados a cada 24h e suas atividades enzimáticas dosadas, os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 12.

Figura 12- Atividades enzimáticas medidas ao longo das fermentações com diferentes fontes de carbono. Em (a) atividade enzimática de β -glicosidase e em (b) pectinase.



O Farelo de soja e o Bagaço cítrico se destacaram por induzirem significativamente a produção de β -glicosidase pelo fungo, sendo alcançados valores de $2,54$ e $1,82 \text{ UmL}^{-1}$, respectivamente, em 5 dias de incubação. Em cultivos semelhantes às do presente trabalho, realizadas por Robl et al (2015), os valores de β -glicosidase reportados ficaram próximos aos

obtidos aqui sendo, 3,9 UmL⁻¹ quando utilizado farelo de soja e 2,5 UmL⁻¹ quando utilizado bagaço cítrico. Já em pesquisa com outro micro-organismo, *Monascus purpureus*, Daroit (2007) obteve valores de β -glicosidase inferiores aos obtidos pelo *A. stygium*, sendo eles: 0,83 UmL⁻¹ e 1,10 UmL⁻¹, em 9 dias de fermentação utilizando, respectivamente, farelo de soja (20 gL⁻¹), e farelo de soja (20gL⁻¹) mais peptona(5gL⁻¹), como fontes de carbono.

Em relação à pectinase, a fonte de carbono com maior produção deste biocatalizador foi bagaço de maçã, 2,92 UmL⁻¹, seguido pelo bagaço cítrico, 2,36 UmL⁻¹. Sendo estes resíduos ricos em pectina este resultado vem ao encontro do que é reportado por Carvalho (2016), que a atividade de pectinases é maior quando o micro-organismo é cultivado em substratos contendo pectina. Resultados de pectinase semelhantes aos deste trabalho foram obtidos por Robl et al. (2015), 3,0 UmL⁻¹ em substrato contendo bagaço cítrico e 2,8 UmL⁻¹ em cultivos com bagaço de maçã.

Sendo o objetivo do trabalho a síntese das duas enzimas em um mesmo meio de produção a sequência dos experimentos se deram utilizando o bagaço cítrico como fonte de carbono.

4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um planejamento experimental utilizando a metodologia de Plackett & Burman para um delineamento de quais componentes presentes no meio de cultivo afetam significativamente a secreção de pectinases e β -glicosidases. Extratos enzimáticos dos ensaios foram retirados em 48, 72 e 144h de cultivo, dosados para as enzimas de interesse neste trabalho e os resultados foram avaliados com programa Protimiza Experimental Design.

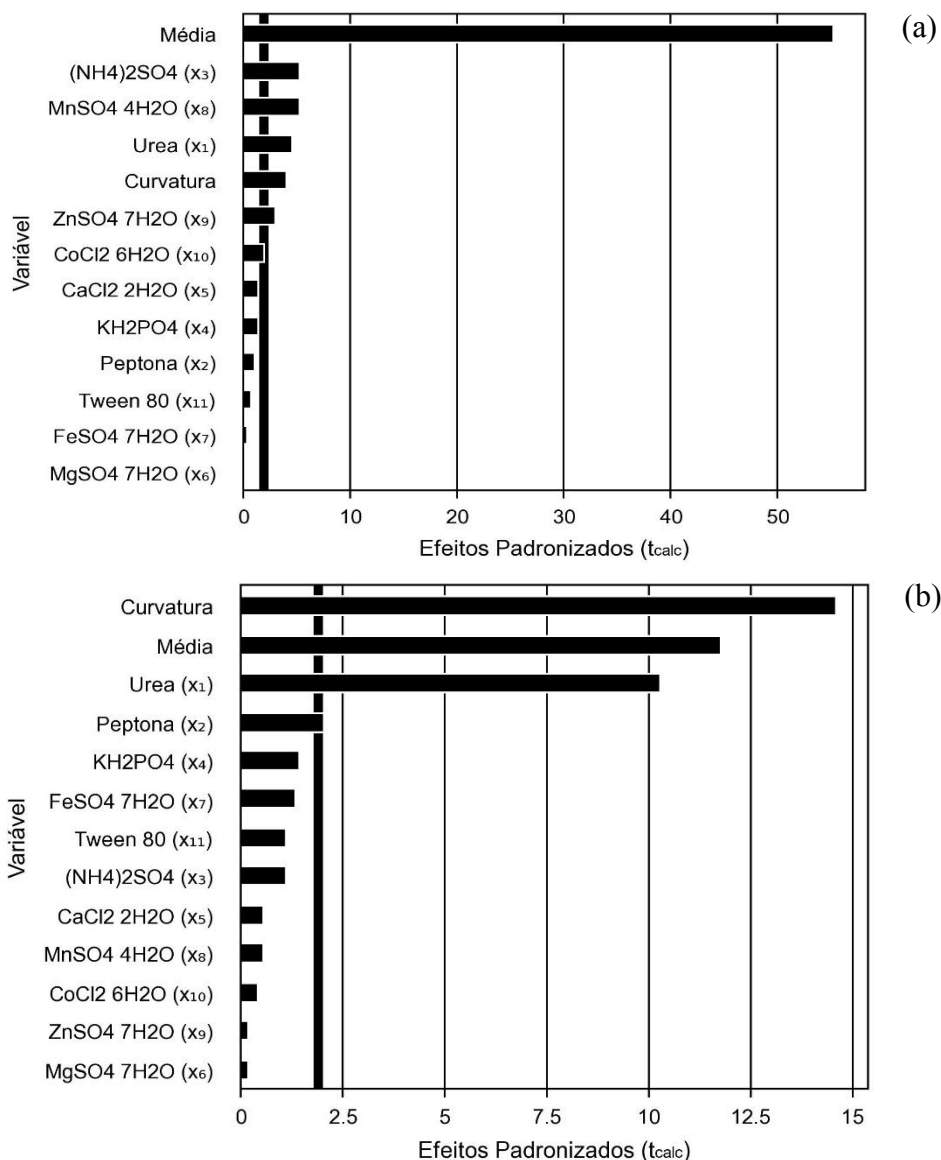
Tanto nas dosagens realizadas em 48 horas, quanto naquelas realizadas em 72h de fermentação não apresentaram diferenças significativas estatisticamente quanto a produção de pectinase, apesar de ter sido nestes pontos a obtenção dos maior título desta enzima: 3,26 UmL⁻¹, no ensaio 8, em 48h, e 3,45 UmL⁻¹ nos pontos centrais, em 72h. Para β -glicosidase, nestes mesmos pontos dosados, os resultados apresentam diferença estatística significativa, entretanto como os títulos desta enzima nestes pontos foram muito baixos foi priorizado o resultado obtido com as dosagens feitas em 144h de fermentação, mostrados na Tabela 3. A composição dos diferentes ensaios pode ser vista no Anexo A e o resultado completo das dosagens enzimáticas no Anexo B.

Tabela 8- Dosagens enzimáticas dos ensaios do planejamento experimental em 144h de fermentação.

Amostra	Pectinase (Uml⁻¹)	β-glicosidase (Uml⁻¹)
1	1,73	0,41
2	1,36	0,71
3	1,69	0,60
4	2,14	0,81
5	1,56	0,00
6	1,75	0,42
7	1,19	0,28
8	2,44	0,59
9	1,58	0,70
10	1,63	0,02
11	1,56	0,01
12	1,41	0,81
13	1,65	0,04
14	1,49	0,00
15	1,52	0,01
16	1,36	0,00
Ponto central 1	1,93	1,25
Ponto central 2	1,96	1,29
Ponto central 3	1,82	1,30

A partir dos resultados para atividade enzimática obtidos em 144h de fermentação o programa Protimiza Experimental Design forneceu diagramas de Pareto (Figura 13), no qual se ilustra as variáveis significativas ($p < 0,1$).

Figura 13- Diagramas de Pareto dos experimentos referentes ao planejamento experimental em 144h de fermentação, em: (a) pectinase e (b) β -glicosidase.



O Diagrama de Pareto ilustra a análise da significância das variáveis para o modelo – mostrado pelo valor da probabilidade onde valores inferiores a 0,1 representam parâmetros com 90% de probabilidade de ser significativo (CARVALHO, 2016) – e o tipo dos efeitos (positivo ou negativo) sobre as atividades enzimáticas (BASTOS, SABRINA CARVALHO, 2012). Desta maneira, podemos observar na Figura 13a que para a produção de pectinase os componentes do meio de cultivo que foram significativos, alterando a resposta da síntese desta pelo *A. stygium* foram: Ureia, MnSO₄.H₂O, (NH₄)₂SO₄ e ZnSO₄.7H₂O. A Tabela 4 mostra os valores calculados pelo programa de estatística, onde é possível observar que o efeito da adição de Ureia, MnSO₄.H₂O e (NH₄)₂SO₄ no meio foi positivo, influenciando um aumento na secreção de pectinase, já a adição de ZnSO₄.7H₂O apresentou um efeito negativo, mostrando

que mesmo em concentrações muito baixas este componente influencia diminuindo a secreção desta enzima pelo fungo estudado. Pesquisas com *Penicillium corylophilum* e *Penicillium simplicissimum*, como no presente trabalho, reportaram aumento significativo na produção de pectinase quando os meios de cultivo foram suplementados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou ureia (JÚNIOR, 2014). Fontes não proteicas de nitrogênio no meio de cultura influenciam positivamente, uma vez que não induzem a produção de proteases e não limitam o fornecimento de nitrogênio para a síntese das glicohidrolases (SOUZA, 2015).

Tabela 9- Análise estatística do planejamento Plackett & Burman aplicando as dosagens enzimáticas de pectinase (144h).

Nome	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	1,63	0,03	55,27	0
Curvatura	0,54	0,13	4,08	0,0047
Ureia (x_1)	0,27	0,06	4,54	0,0027
Peptona (x_2)	-0,06	0,06	-0,98	0,3618
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (x_3)	0,31	0,06	5,22	0,0012
KH_2PO_4 (x_4)	-0,08	0,06	-1,36	0,2168
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (x_5)	0,08	0,06	1,4	0,2043
$\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (x_6)	0	0,06	-0,04	0,9674
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (x_7)	-0,02	0,06	-0,34	0,7443
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (x_8)	0,31	0,06	5,71	0,013
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (x_9)	-0,18	0,06	-3,01	0,0196
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (x_{10})	0,12	0,06	-1,95	0,092
Tween 80 (x_{11})	-0,04	0,06	-0,72	0,4942

Para a produção de β -glicosidase, os componentes do meio que apresentaram significância foram: ureia e peptona. Além disso, na Tabela 5 podemos ver que estes componentes influenciaram positivamente a produção desta enzima pelo *A. stygium*. Nenhum dos componentes que compõem a solução de sais presentes no meio de cultivo apresentou efeito significativo na secreção de β -glicosidase por este micro-organismo.

A peptona é um hidrolisado enzimático de carne que fornece nitrogênio principalmente na forma de aminoácidos. Desta forma, assim como a ureia e o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ esta fonte de carbono fornece condições para a síntese de pectinase e β -glicosidase sem induzir a produção de proteases extracelulares.

Tabela 10- Análise estatística do planejamento Plackett & Burman aplicando as dosagens enzimáticas de β -glicosidase (144h)

Nome	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	0,3400	0,0300	11,7700	0,0000
Curvatura	1,8700	0,1300	14,6200	0,0000
Ureia (x_1)	0,5900	0,0600	10,2800	0,0000
Peptona (x_2)	0,1200	0,0600	2,0300	0,0819
(NH_4) $_2$ SO $_4$ (x_3)	-0,0600	0,0600	-1,1100	0,3023
KH $_2$ PO $_4$ (x_4)	0,0800	0,0600	1,4200	0,1989
CaCl $_2$ 2H $_2$ O (x_5)	-0,0300	0,0600	-0,5500	0,6022
MgSO $_4$ 4H $_2$ O (x_6)	0,0100	0,0600	0,2000	0,8498
FeSO $_4$ 7H $_2$ O (x_7)	0,0800	0,0600	1,3300	0,2247
MnSO $_4$ 4H $_2$ O (x_8)	-0,0300	0,0600	-0,5500	0,6022
ZnSO $_4$ 7H $_2$ O (x_9)	-0,0100	0,0600	-0,2000	0,8498
CoCl $_2$ 6H $_2$ O (x_{10})	-0,0200	0,0600	-0,4100	0,6907
Tween 80 (x_{11})	-0,0400	0,0600	1,1100	0,3023

Por fim, com o resultado do delineamento dos componentes do meio de produção enzimática somado ao objetivo de produzir as enzimas em um mesmo meio concluiu-se que novos planejamentos experimentais, composto central (DCC) ou composto central rotacional devem ser realizados variando a concentração de ureia, (NH_4) $_2$ SO $_4$ e MnSO $_4$ 4H $_2$ O e retirando o ZnSO $_4$ 7H $_2$ O do meio.

5 CONCLUSÃO

Na padronização do inóculo, foi possível observar que estudos desta etapa são fundamentais para definir a melhor opção de obtenção da biomassa micelial e evitar uma possível repressão catabólica de carbono causada pelo uso de glicose como fonte de carbono no meio de pré-cultivo. Entre as opções testadas a obtenção da biomassa micelial através da fragmentação em *blender* e frutose como fonte de carbono se mostraram as melhores opções.

O uso do substrato lignocelulósico, bagaço cítrico, como fonte de carbono para o cultivo submerso do *Annulohypoxylon stygium*, se mostrou a melhor opção para a síntese enzimática de pectinase e β -glicosidase. A utilização deste material contribui para reduzir o custo final de produção destas enzimas, por ser um produto de baixo valor agregado.

O planejamento experimental realizado mostrou que meios de cultivo contendo maiores concentrações dos compostos nitrogenados ureia e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; além de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, a produção de pectinase e β -glicosidase foi influenciada positivamente, o que indica que novos planejamentos experimentais variando a concentração destes componentes devem ser feitos visando uma contínua otimização desse meio de cultura afim de obter maiores títulos destes biocatalisadores.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Após o resultado da seleção dos componentes do meio de cultivo que influenciam positivamente a secreção das enzimas trabalhadas, pelo *A. stygium* DR47, novos planejamentos experimentais devem ser realizados, ajustando as concentrações destes componentes no meio de produção e assim continuar a otimização da produção destes biocatalisadores.

REFERÊNCIAS

- BASTOS, A. Enzimas: a chave da biotecnologia e segurança. **Biotecnologia e segurança** v. 11, dez. 2015.
- BASTOS, Sabrina Carvalho. **Pectinases de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries: condições de cultivo, purificação parcial e caracterização**. Universidade Federal de Lavras, 2012. 133 p.
- BERG, Jeremu M; STRYER, Lubert; TYMOCZO, JOHN, L. **Bioquímica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. .
- BERGER, Markus. Pectinases E Pectina : Aplicação Comercial E Pectinase and Pectin : Commercial Application and Biotechnological. **Caderno pedagógico** p. 130–139 , 2014.
- BERLIN, Alex *et al.* Optimation of Enzyme Complexes for Lignocellulose Hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering** v. 97, n. 2, p. 287–296 , 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry** p. 248–254 , 1976.
- BRODEUR, Gary *et al.* Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. **Enzyme Research** v. 2011, p. 1–17 , 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/er/2011/787532/>>.20900414.
- BROWN, N. A. *et al.* Functional characterisation of the non-essential protein kinases and phosphatases regulating *Aspergillus niger* hydrolytic enzyme production. **Biotechnology for Biofuels** v. 6, n. 1, p. 91 , 2013.
- CARVALHO, Márcia Corrêa De. Bioprodução de pectinase a partir de resíduo agroindustrial para aplicação em produtos vegetais. , 2016. Disponível em: <[file:///C:/Users/OEM/Downloads/Marcia Correa de Carvalho.pdf](file:///C:/Users/OEM/Downloads/Marcia%20Correa%20de%20Carvalho.pdf)>.
- CASTRO, Aline Machado; JUNIOR, Nei Pereira. Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova** v. 33, n. 1 , 2010.
- CHEETHAM, P.S.J. The Applications of enzymes in industry. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. 2. ed. Michigan: E. Horwood, 1985. p. 457.
- DAROIT, D. J. Caracterizacao de uma Beta-Glicosidase de *Monascus purpureus*. p. 137 , 2007. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/11735/000595948.pdf?..>>.
- DELABONA, Priscila da Silva *et al.* Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -l-arabinofuranosidase. **Bioresource Technology** v. 131, p. 500–507 , 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.105>>.1873-2976 (Electronic) 0960-8524 (Linking).
- DEWAN, S.S. *Global Markets for enzymes in Industrial Applications* . [S.l.]: BCC Research. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research>>. , 2017
- DIAS, Marina O.S. *et al.* Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? **Bioresource Technology** v. 102, n. 19, p. 8964–8971 , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.098>>.1873-2976 (Electronic)r0960-8524 (Linking).

DILLON, Aldo J.P. *et al.* Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 70, n. 6, p. 740–746 , 2006.

DODD, DYLAN; CANN, ISAAC K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy** v. 1, n. 1, p. 2–17 , 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x>>.1757-1693 (Print)r1757-1693 (Linking).

DRYSDALE, M. R.; KOLZE, S. E.; KELLY, J. M. The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*. **Gene** v. 130, n. 2, p. 241–245 , 1993.

DUTRA, Thiago Rodrigues. **Influência das fontes de carbono na indução de celulasas e hemicelulasas em *Chrysosporthe Cubensis* cultivado em meio líquido**. Universidade Federal de Viçosa, 2013. 56 p.

FARINAS, Cristiane Sanchez. *A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação* . São Carlos: Embrapa Instrumentação. , 2011

FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**. UNIT - Universidade Tiradentes, 2009.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de Lipases por fermentação no estado sólido e utilização em biocatálise**. Universidade Federal do Paraná, 2007. 120 p.

FOURNIER, Jacques *et al.* The new genus *Rostrohypoxyton* and two new *Annulohypoxyton* species from Northern Thailand. **Fungal Diversity** v. 40, p. 23–36 , 2010.

FUJII, Tastsuya; INOUE, Hiroyuki; ISHIKAWA, Kazuhiko. Enhancing cellulase and hemicellulase production by genetic modification of the carbon catabolite repressor gene, *creA*, in *Acremonium cellulolyticus*. **ABM Express** v. 3, p. 73 , 2013.

GUSAKOV, Alexander V. *et al.* Design of Highly Efficient Cellulase Mixtures for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. **Biotechnology and Bioengineering** v. 97, n. 5, p. 1028–1038 , 2007.

HARDIMAN, Elizabeth *et al.* Directed evolution of a thermophilic β -glucosidase for cellulosic bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 161, n. 1–8, p. 301–312 , 2010.

JÚNIOR, Pascoal José Gaspar. **“Caracterização de holocelulasas fúngicas na otimização da biomassa lignocelulósica”**. Universidade Estadual de Campinas, 2014. 187 p.

KUMAR, V. *et al.* Global market scenario of industrial enzymes. **Industrial enzymes: Trends, scope and relevance**. 1. ed. New York: Nova Science Publishers, 2014. p. 197.

LOGUERCIO-LEITE, Clarice *et al.* A particularidade de ser um fungo - I. Constituintes celulares. **Biotemas** v. 19, n. 2, p. 17–27 , 2006.

MACIEL, O. M. C. **Avaliação do potencial fotoprotetor e identificação de metabólitos secundários do fungo *Annulohypoxyton stygium* associado à alga marinha**. Universidade de São Paulo, 2016. 109 p.

MACRELLI, Stefano; MOGENSEN, Johan; ZACCHI, Guido. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnology for Biofuels** v. 5, n. 1, p. 22 , 2012. Disponível em: <<http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-5-22>>.1754683452.

MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Analytical Chemistry** p. 816–826 , 1960.

MARTÍN, Carlos *et al.* Investigation of cellulose convertibility and athanolic fermentation of sugarcane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology** v. 81, p. 1669–1677 , 2006.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry** , 1959.

MONTEIRO, Valdirene N.; SILVA, Roberto Do Nascimento. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista processos químicos** v. 3, p. 9–23 , 2009.

NAKARI-SETÄLÄ, Tiina *et al.* Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. **Applied and Environmental Microbiology** v. 75, n. 14, p. 4853–4860 , 2009.

NELSON, David L; COX, Michael M. Princípios de bioquímica de Lehninger. p. 1250 , 2014.978-85-8271-073-9.

NETO, José Abrahão. Algumas aplicações de enzimas. In: LIMA, U.A; AQUARONE, E; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. (Org.). **Biotecnologia Industrial Vol 3**. São Paulo: [s.n.], 2001. p. 1328.

NISA, Humeera *et al.* Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis** v. 82, n. April, p. 50–59 , 2015.0882-4010.

OGEDA, Thais Lucy; PETRI, Denise F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova** v. 33, n. 7 , 2010.

P. DE VRIES, Ronald; VISSER, Jaap; DE GRAAFF, Leo H. CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. **Research in Microbiology** v. 150, n. 4, p. 281–285 , 1999.0923-2508 (Print)r0923-2508 (Linking).

PENG, Xiao *et al.* Hydrolysis of cellobiose to monosaccharide catalyzed by functional Lanthanum(La^{3+}) metallomicelle. **RSC Adv.** v. 5, n. 13, p. 9348–9353 , 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4RA14521F>>.

ROBL, Diogo *et al.* Enhancing of sugar cane bagasse hydrolysis by *Annulohypoxylon stygium* glycohydrolases. **Bioresource Technology** v. 177, p. 247–254 , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.082>>.1873-2976 (Electronic)r0960-8524 (Linking).

ROBL, Diogo *et al.* The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC biotechnology** v. 13, p. 94 , 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3840621&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24175970%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3840621>>.1472-6750.

ROBL, Diogo. **HEMICELULASES E PROTEÍNAS ACESSÓRIAS DE FUNGOS FILAMENTOSOS E DE ACTINOMICETOS** Diogo Robl Hemicelulases e proteínas acessórias de fungos filamentosos e de actinomicetos para desconstrução de biomassa lignocelulósica São Paulo. USP, 2015. 162 p.

RODRIGUES-ZUNIGA, U. F. *et al.* *Aspergillus niger* production of cellulases by solid-state fermentation. **Pesquisas Agropecuárias Brasileiras** p. 912–919 , 2011.

- RODRIGUES, Cristiane. Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. **Biotecnologia Aplicada a Agroindústria** p. 283–314 , 2014. Disponível em: <<http://www.epa.gov/climatestudents/basics/today/greenhouse-gases.html>>.
- RUIJTER, G. J.; VISSER, J. Carbon repression in *Aspergilli*. **FEMS Microbiol Lett** v. 151, n. 2, p. 103–114 , 1997.
- SANTOS, F. A. *et al.* Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química nova** v. 37, n. 1 , 2014.
- SANTOS, F. A. *et al.* Potencial de palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química nova** v. 35, n. 5 , 2012.
- SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculos de cajú como substrato**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007. 148 p.
- SILVA, Vinícius Fernandes Nunes. **Estudod de pré-tratamonto e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. Universidade de São Paulo, 2009. 113 p.
- SOUZA, Paula Monteiro. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro**. Universidade de São Paulo, 2015. 133 p.
- SULTAN, Sadia *et al.* Structure and absolute configuration of 20 β -hydroxyprednisolone, a biotransformed product of prednisolone by the marine endophytic fungus *penicilium lapidosum*. **Molecules** v. 19, n. 9, p. 13775–13787 , 2014.6033258460.
- UENOJO, Mariana; PASTORE, Glaucia Maria. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. **Quimica Nova** v. 30, n. 2, p. 388–394 , 2007.0100404220070.
- VILELA, Denise Sousa. **Análise da produção de celulasas e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces* sp.** Universidade Federal de Goiás, 2013. 89 p.
- WEI, D. L. *et al.* Production of cellulolytic enzymes from the *Xylaria* and *Hypoxylon* species of xylariaceae. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** v. 8, n. 2, p. 141–146 , 1992. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01195834>>.
- WITHERS, S. G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. **Carbohydrate Polymers** v. 44, n. 4, p. 325–337 , 2001.0144-8617.
- ZANOELO, Fabiana Fonseca *et al.* β -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters** v. 240, n. 2, p. 137–143 , 2004.
- ZÚÑIGA, Ú. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. Universidade de São Paulo, 2010. 288 p.

ANEXO A – Composição dos meios ensaiados no planejamento experimental.

Ensaio	Ureia (g ^L ⁻¹)	Peptona (g ^L ⁻¹)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g ^L ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ (g ^L ⁻¹)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g ^L ⁻¹)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g ^L ⁻¹)	FeSO ₄ .7H ₂ O (mg ^L ⁻¹)	MnSO ₄ .4H ₂ O (mg ^L ⁻¹)	ZnSO ₄ . 7H ₂ O (mg ^L ⁻¹)	CoCl ₂ . 6H ₂ O (mg ^L ⁻¹)	Tween 80 (mL ^L ⁻¹)
1	0,6	0	0	0	0,8	0	0	3,2	2,8	0	2
2	0,6	2	0	0	0	0,6	0	0	2,8	4	0
3	0,6	2	2,8	0	0	0	100	0	0	4	2
4	0,6	2	2,8	4	0	0	0	3,2	0	0	2
5	0	2	2,8	4	0,8	0	0	0	2,8	0	0
6	0,6	0	2,8	4	0,8	0,6	0	0	0	4	0
7	0	2	0	4	0,8	0,6	100	0	0	0	2
8	0,6	0	2,8	0	0,8	0,6	100	3,2	0	0	0
9	0,6	2	0	4	0	0,6	100	3,2	2,8	0	0
10	0	2	2,8	0	0,8	0	100	3,2	2,8	4	0
11	0	0	2,8	4	0	0,6	0	3,2	2,8	4	2
12	0,6	0	0	4	0,8	0	100	0	2,8	4	2
13	0	2	0	0	0,8	0,6	0	3,2	0	4	2
14	0	0	2,8	0	0	0,6	100	0	2,8	0	2
15	0	0	0	4	0	0	100	3,2	0	4	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0,3	1	1,4	2	0,4	0,3	50	1,6	1,4	2	1
18	0,3	1	1,4	2	0,4	0,3	50	1,6	1,4	2	1
19	0,3	1	1,4	2	0,4	0,3	50	1,6	1,4	2	1
20	0,3	1	1,4	2	0,4	0,3	50	1,6	1,4	2	1

ANEXO B – Dosagens enzimáticas dos ensaios do planejamento experimental.

Ensaio	48h de fermentação		72h de fermentação		144h de fermentação	
	Pectinase (UmL ⁻¹)	β-glicosidase (UmL ⁻¹)	Pectinase (UmL ⁻¹)	β-glicosidase (UmL ⁻¹)	Pectinase (UmL ⁻¹)	β-glicosidase (UmL ⁻¹)
1	1,21	0,001	2,60	0,01	1,73	0,40
2	1,87	0,000	2,79	0,28	1,36	0,69
3	1,48	0,009	0,00	0,10	1,69	0,56
4	1,78	0,042	3,18	0,18	2,14	0,81
5	1,95	0,003	0,00	0,00	1,56	0,00
6	1,34	0,000	0,00	0,01	1,75	0,42
7	1,26	0,003	0,00	0,00	1,19	0,28
8	3,26	0,000	2,77	0,02	2,44	0,58
9	1,52	0,021	2,71	0,19	1,58	0,68
10	1,17	0,002	2,34	0,00	1,63	0,02
11	2,39	0,001	0,00	0,00	1,56	0,00
12	1,63	0,003	3,12	0,27	1,41	0,81
13	1,16	0,003	2,10	0,00	1,65	0,04
14	1,40	0,000	2,14	0,01	1,49	0,00
15	1,95	0,018	2,24	0,05	1,52	0,00
16	1,21	0,013	2,19	0,04	1,36	0,00
PC 1	1,69	0,008	3,38	0,11	1,93	1,30
PC 2	1,71	0,008	3,41	0,13	1,96	1,32
PC 3	1,78	0,011	3,55	0,12	1,82	1,30